



**HAL**  
open science

## Compartimentation des nucléotides cycliques dans le coeur

Grégoire Vandecasteele, Delphine Mika, Guillaume Pidoux, Rodolphe  
Fischmeister

► **To cite this version:**

Grégoire Vandecasteele, Delphine Mika, Guillaume Pidoux, Rodolphe Fischmeister. Compartimentation des nucléotides cycliques dans le coeur. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*, GRRC, 3ème édition, éditions JOHN LIBBEY EUROTTEXT. 2019., pp.47-54, 2019. hal-02896626

**HAL Id: hal-02896626**

**<https://hal.science/hal-02896626v1>**

Submitted on 10 Jul 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Compartimentation des nucléotides cycliques dans le cœur

Grégoire Vandecasteele, Delphine Mika, Guillaume Pidoux, Rodolphe Fischmeister

UMR-S 1180, Inserm, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

## **Correspondance:**

Grégoire Vandecasteele

UMR-S1180

Faculté de Pharmacie - Université Paris-Sud

5, Rue J.-B. Clément

F-92296 Châtenay-Malabry Cedex

France

Tel: 01 46 83 57 17

Fax: 01 46 83 54 75

[gregoire.vandecasteele@u-psud.fr](mailto:gregoire.vandecasteele@u-psud.fr)

## Introduction

Les nucléotides cycliques (NC) 3'-5' adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et 3'-5' guanosine monophosphate cyclique (GMPc) constituent des régulateurs majeurs du système cardiovasculaire. L'AMPC agit comme relai intracellulaire pour les neuromédiateurs des systèmes sympathique et parasympathique ainsi que pour plusieurs hormones, tandis que le GMPc est le second messenger du monoxyde d'azote (NO) et des peptides natriurétiques. A court terme, les NC régulent l'activité contractile cardiaque et le tonus vasculaire. Toutefois, une élévation chronique d'AMPC contribue au développement de l'hypertrophie cardiaque et à la progression vers l'insuffisance cardiaque (IC), alors qu'une élévation chronique de GMPc a une action anti-hypertrophique et cardioprotectrice. Pendant longtemps on a considéré que ces seconds messagers une fois produits diffusaient librement à l'intérieur des cellules. Ceci est toutefois contradictoire avec un certain nombre d'observations qui montrent que la nature de la réponse physiologique dépend du stimulus appliqué et du type de récepteur activé. On sait aujourd'hui que cette spécificité de réponse hormonale est due à une organisation spatio-temporelle (ou compartimentation) des voies de signalisation. Celle-ci fait intervenir d'une part la localisation des voies de synthèse et des effecteurs des NC, et d'autre part le contrôle des concentrations locales d'AMPC et de GMPc par les phosphodiésterases des NC (PDEs), les enzymes responsables de leur dégradation.

# 1. Voie de l'adénosine monophosphate cyclique

Dans les myocytes cardiaques, les niveaux d'AMPc sont augmentés par les catécholamines, ainsi que par de nombreuses hormones et facteurs circulants. Ces différents « premier messagers » agissent en se fixant à des récepteurs spécifiques couplés à des protéines G stimulatrices ( $G_s$ ) des adénylyl cyclases (AC), les enzymes responsables de la synthèse d'AMPc. Dans certains cas, comme l'activation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques ( $\beta_1$ -ARs, qui représentent 80% des récepteurs  $\beta$ -ARs dans le cœur) par les catécholamines ou l'isoprénaline (Iso), l'élévation d'AMPc provoque une augmentation importante de la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif), de la force de contraction (effet inotrope positif), et de la vitesse de relaxation (effet lusitrope positif). Ces effets sont dus à la phosphorylation des acteurs majeurs du couplage excitation-contraction (CEC) par la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) tels que les canaux calciques de type L du sarcolemme (LTCC), les récepteurs de la ryanodine (RyR2) du réticulum sarcoplasmique (RS), le phospholamban (PLB), la troponine I (TnI) et la protéine C de liaison à la myosine (cMyBP-C) (pour plus de détails concernant le CEC cardiaque, voir chapitre 5). Toutefois, dans d'autres cas, comme l'activation des récepteurs EP2 et EP4 couplés à  $G_s$  par la prostaglandine E1 ( $PGE_1$ ), une élévation d'AMPc dans le cœur n'augmente pas la phosphorylation des protéines du CEC et ne reproduit pas les effets inotrope et lusitrope positifs d'une stimulation  $\beta_1$ -AR, mais a d'autres fonctions (pour revue voir [1]). Ceci introduit la notion de compartimentation de la voie de l'AMPc qui a fait l'objet de nombreux travaux dans les myocytes cardiaques.

## 1.1 Voies de synthèse de l'AMPc

Un premier élément concerne la localisation subcellulaire des récepteurs couplés à  $G_s$  et des AC dans des domaines spécialisés de la membrane plasmique des cardiomyocytes comme les

tubules transverses (tubules T) et les cavéoles[2]. Alors que les récepteurs  $\beta_1$ -ARs sont distribués sur l'ensemble de la membrane plasmique, les  $\beta_2$ -ARs semblent localisés au niveau des tubules T et des cavéoles tandis que les récepteurs aux prostaglandines EP2 et EP4 semblent exclus des cavéoles. La localisation cavéolaire des  $\beta_2$ -ARs confine leur action à la membrane plasmique et permet la régulation locale de l'activité des canaux LTCC (responsables du courant  $I_{Ca,L}$ ) par ces récepteurs, tandis que l'exclusion des récepteurs aux prostaglandines des cavéoles pourrait expliquer leur absence d'effet sur  $I_{Ca,L}$ . Une localisation subcellulaire distincte a également été proposée pour les AC5 et AC6, les isoformes majoritaires d'AC exprimées dans le cœur. L'étude de la régulation de  $I_{Ca,L}$  dans des cardiomyocytes de souris invalidées pour ces enzymes suggère que l'AC5 peut être activée par les récepteurs  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_2$ -ARs car elle est localisée au niveau des tubules T et des cavéoles, tandis que l'AC6 est couplée préférentiellement aux  $\beta_1$ -ARs en dehors des tubules T [3]. Malgré de fortes similitudes en termes de séquence et de régulation, de façon surprenante, ces deux AC exercent des effets chroniques opposés sur le cœur : bénéfiques pour l'AC6 mais délétères pour l'AC5. Ces différences pourraient être liées, au moins en partie, à leur localisation subcellulaire distincte [4].

## **1.2 Localisation des effecteurs de l'AMPc**

En absence d'AMPc, la PKA est un hétérotétramère composé d'un dimère de sous-unités régulatrices (R) qui fixent et inhibent deux sous-unités catalytiques (C). Lors d'une élévation d'AMPc, les sous-unités C se détachent du dimère de sous-unités R pour phosphoryler leurs substrats. Deux types de PKA (PKAI et PKAII) sont exprimés dans le cœur, distingués par la nature de leurs sous-unités régulatrices (appelées RI et RII). Ces deux types diffèrent par leur sensibilité à l'AMPc et leur localisation subcellulaire: alors que la PKAI est principalement retrouvée dans la fraction soluble, la PKAII est associée à la fraction particulaire [1].

La localisation subcellulaire de la PKA est assurée par des protéines d'ancrage, les AKAP (*A-kinase anchoring proteins*). Les AKAP constituent une famille de protéines qui se définissent par 1/ leur capacité à fixer la sous-unité R de la PKA à un domaine d'ancrage structurellement conservé ; 2/ la présence d'un domaine unique et spécifique de localisation subcellulaire (e.g. la membrane plasmique, le RS ou d'autres organelles) ; 3/ l'existence de motifs d'interactions protéine-protéine pour former des complexes incluant divers acteurs de signalisation, tels que des protéines phosphatases (PP), diverses kinases, des PDEs, des canaux ioniques et des récepteurs membranaires ; 4/ une interaction directe ou une co-localisation avec les substrats de la PKA [6]. Ainsi, l'ancrage de la PKA aux AKAP assure la compartimentation subcellulaire de l'enzyme et joue un rôle important dans le contrôle du CEC (voir ci-dessous) mais également lors de la phase de repolarisation cellulaire (i.e. régulation du courant potassique  $I_{Ks}$ ) ou encore de l'hypertrophie cardiaque [7].

Outre la PKA, l'AMPc agit également en se liant aux protéines EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*) [8], aux canaux HCN (*Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated*) responsables du courant de pacemaker  $I_f$  [9] et aux protéines contenant un domaine Popeye, également impliquées dans le contrôle de la fonction pacemaker cardiaque [10]. Lorsqu'elles sont stimulées par l'AMPc, les protéines EPAC catalysent l'échange de GDP en GTP sur les petites protéines G, Rap1 et Rap2, induisant ainsi leur activation. Alors que les canaux HCN et les protéines Popeye sont localisées à la membrane plasmique, les deux isoformes d'EPAC sont distribuées dans de multiples compartiments: EPAC1 est localisé à la membrane plasmique et à l'enveloppe nucléaire où il module l'expression des gènes du programme hypertrophique mais a également été décrit dans les mitochondries où il agit comme effecteur de l'AMPc généré par une AC soluble également présente dans les mitochondries [8, 11-13]. En revanche, EPAC2 est localisé dans les tubules T et intervient dans la phosphorylation

des RyR2 par la  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin kinase II (CaMKII), augmentant la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS et le risque d'arythmies cardiaques [11].

### 1.3 Contrôle de l'AMPc par les phosphodiesterases

Plusieurs mécanismes sont susceptibles de limiter la diffusion de l'AMPc dans les cardiomyocytes, mais le mieux documenté est l'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs. Le fait que l'isobutyl méthyl xanthine (IBMX), un inhibiteur non sélectif des PDEs, augmente l'effet distant d'une stimulation  $\beta$ -AR locale sur le courant  $I_{\text{Ca,L}}$  a montré que ces enzymes jouent un rôle majeur pour limiter la diffusion de l'AMPc [14]. Ceci a pu être confirmé par des techniques de mesure en temps réel de l'AMPc: l'enregistrement en patch-clamp de l'activité électrique de canaux CNG (*Cyclic nucleotide-gated channels*) mutés pour reconnaître spécifiquement l'AMPc permet de mesurer les fluctuations de ce second messenger sous la membrane plasmique (Figure 1A), tandis que la mesure du transfert d'énergie de fluorescence par résonance de type Förster (FRET) de biosenseurs reconnaissant l'AMPc permet de mesurer ce second messenger dans le cytoplasme ou dans de nombreux compartiments subcellulaires (membrane plasmique, cavéoles, membrane du RS, noyaux, mitochondries, myofilaments, Golgi...).

Le premier bio-senseur FRET utilisé pour mesurer l'AMPc était basé sur la PKA. Le principe de fonctionnement de cette sonde exploite le fait que les sous-unités C se dissocient du dimère de R en présence d'AMPc (Figure 1B). Son utilisation dans des cardiomyocytes néonataux de rat a montré qu'une stimulation des récepteurs  $\beta$ -ARs produit une augmentation d'AMPc hétérogène et que cette compartimentation spatiale est liée aux PDEs, puisqu'en présence d'IBMX l'augmentation d'AMPc produite par les  $\beta$ -AR devient beaucoup plus homogène [15]. Par la suite, le rôle des différentes familles de PDEs dans le contrôle dynamique de l'AMPc a été étudié grâce aux canaux CNG et à des senseurs FRET de l'AMPc de nouvelle génération, basés sur le domaine de liaison à l'AMPc des protéines EPAC ou des canaux HCN (Figure 1C).

Sur les 11 familles de PDEs connues chez les mammifères, sept sont exprimées dans le cœur (Figure 2). Ces PDEs diffèrent par leur structure primaire, leurs propriétés enzymatiques, leur capacité à dégrader l'AMPc et/ou le GMPc, ainsi que par leurs mécanismes de régulation [16, 17]. La plupart des familles de PDEs sont codées par plusieurs gènes, donnant lieu à une centaine d'isoformes au total, produites par épissage alternatif et par l'utilisation de multiples sites d'initiation de la traduction. Quatre familles de PDEs sont clairement établies pour dégrader l'AMPc dans les cardiomyocytes : la PDE1, qui est activée par le complexe  $Ca^{2+}$ -calmoduline; la PDE2, dont l'activité est stimulée de façon allostérique par le GMPc, celui-ci se liant au niveau du domaine GAFB de l'enzyme (l'acronyme GAF est issu des trois protéines dans lesquelles ce domaine a été identifié : cGMP-dependent phosphodiesterases, *Anabaena* adenylyl cyclases, and *E. Coli* FhlA); la PDE3, qui est inhibée par le GMPc et la PDE4, qui est spécifique de l'AMPc. En raison d'un manque d'inhibiteur pharmacologique sélectif disponible commercialement, le rôle de la PDE1 dans la compartimentation des signaux AMPc n'est pas connu. La PDE2 est codée par un seul gène, donnant lieu à trois variants d'épissage (PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3). Alors que la PDE2A1 est cytoplasmique, les PDE2A2 et PDE2A3 sont associées aux membranes [16]. Le rôle de la PDE2 dans la compartimentation des NC a d'abord été examiné dans des cardiomyocytes de grenouille. Dans ces cellules, une stimulation de la guanylate cyclase soluble, l'enzyme responsable de la synthèse de GMPc, conduit à une forte diminution d'AMPc qui reste localisée au voisinage des LTCC, due à l'activation de la PDE2 par le GMPc [18]. De façon similaire, une autre étude sur myocytes de rats nouveau-nés a montré que lors d'une stimulation à l'Iso, la PDE2 est activée par une voie impliquant les récepteurs  $\beta_3$ -ARs, le NO et le GMPc. Ceci limite l'accumulation d'AMPc produite par les autres sous-types de  $\beta$ -ARs, et par conséquent leur effet inotrope positif [19]. Dans le myocyte cardiaque, la PDE2A2 semble localisée au niveau des membranes internes et externes des mitochondries. Il a été proposé récemment que cette isoforme soit impliquée dans la régulation



de la morphologie mitochondriale et de la survie cellulaire en dégradant localement l'AMPc issu des AC du sarcolemme [20].

Les PDE3 et PDE4 représentent les activités hydrolytiques majeures de l'AMPc dans le cœur. La PDE3 constitue la cible de cardiotoniques puissants comme la milrinone, utilisée en clinique pour le traitement de l'insuffisance cardiaque aigüe mais dont l'utilisation chronique augmente la mortalité en favorisant les arythmies cardiaques [21]. Deux gènes codent pour deux sous-familles de PDE3 (PDE3A et 3B), et c'est la PDE3A qui est majoritaire dans le cœur et responsable des effets chronotropes et inotropes positifs des inhibiteurs de PDE3. L'existence de trois isoformes de PDE3A localisées dans des compartiments cellulaires différents (fractions microsomale et/ou cytosolique) participe à la compartimentation de l'AMPc. Toutefois, chez les rongeurs la PDE4 est prédominante pour dégrader l'AMPc généré par une stimulation  $\beta$ -AR, et cette famille régule également l'AMPc et l'homéostasie calcique dans les myocytes ventriculaires de chien et les myocytes atriaux humains [17]. La famille des PDE4 est codée par quatre gènes (*Pde4a-d*), mais seuls *Pde4a*, *Pde4b* et *Pde4d* sont exprimés dans le tissu cardiaque. Les PDE4 sont localisées dans de multiples compartiments cellulaires, notamment par interaction avec des protéines d'échafaudage comme la  $\beta$ -arrestine ou les AKAPs. Les PDE3 et PDE4 sont activées par phosphorylation de leur domaine N-terminal régulateur par diverses kinases, en particulier par la PKA. Cette propriété permet un rétro-contrôle négatif important des taux d'AMPc lors d'une stimulation  $\beta$ -AR [22].

## **1.4 Régulation locale du CEC par les AKAPs et les PDEs**

### **1.4.1 Entrée de calcium par les LTCC**

L'activité des LTCC joue un rôle déterminant dans la régulation du CEC cardiaque. Dans les cardiomyocytes, l'AKAP18 $\alpha/\beta$  (*AKAP15*, *AKAP7*) est ancrée à la face interne du sarcolemme et un motif présent dans la partie C-terminale de la protéine permet une interaction directe avec

les LTCC [23]. Il a été proposé que ce complexe positionne de manière optimale la PKA à proximité des LTCC, permettant ainsi leur phosphorylation directe par la kinase et l'augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. L'AKAP79 (*AKAP5*) interagit également avec les LTCC dans les cardiomyocytes et organise un macrocomplexe de signalisation au niveau du sarcolemme contenant les LTCC, les  $\beta$ -ARs, les AC5 et 6, la PKA, la protéine kinase C (PKC), et la calcineurine (CaN) [24]. Toutefois, l'inactivation de ces deux AKAPs chez la souris n'affecte pas la stimulation  $\beta$ -AR du courant  $I_{\text{Ca,L}}$  [25], indiquant qu'il existe des mécanismes alternatifs ou redondants permettant la régulation  $\beta$ -AR de  $I_{\text{Ca,L}}$ . En dégradant l'AMPc, les quatre familles de PDE (PDE1-4) contribuent à limiter la régulation  $\beta$ -AR du courant  $I_{\text{Ca,L}}$  dans les cardiomyocytes, avec une contribution relative qui varie selon les espèces : chez le rat, PDE4>PDE3>PDE2>PDE1 [26]. Chez la souris, une isoforme particulière de PDE4, la PDE4B, est physiquement associée aux LTCC, permettant de moduler l'AMPc et l'activité PKA localement lors d'une stimulation  $\beta$ -AR [27] (Figure 3).

#### 1.4.2 Libération du calcium par le RyR2

Les effets de la phosphorylation du RyR2 par la PKA sont controversés, toutefois il est admis d'une part que la mAKAP (*AKAP6*) ancre la PKA à proximité du RyR2 et d'autre part que ce rapprochement facilite la phosphorylation de RyR2 par la PKA [28]. La localisation subcellulaire de mAKAP reste à ce jour controversée. Certains auteurs proposent une localisation de cette AKAP au niveau du RS, alors que d'autres équipes proposent une localisation périnucléaire [28, 29]. La phosphorylation de RyR2 par la PKA ancrée à la mAKAP permettrait de dissocier l'interaction entre la protéine FKBP12.6 et le RyR2 et ainsi de favoriser la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  présent dans le RS [29]. Il est à noter que dans les cardiomyocytes le complexe de signalisation mAKAP-PKA ancre également la PDE4D. La kinase est responsable de la phosphorylation de la PDE. Cette modification post-traductionnelle va accroître l'activité

d'hydrolyse de l'AMPc et ainsi diminuer le substrat indispensable à l'activation de la PKA. Ainsi le complexe de signalisation orchestré par la mAKAP permet une activation transitoire de la PKA impliquée dans le processus de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à une stimulation des  $\beta$ -AR (Figure 3).

#### 1.4.3 Régulation du PLB

Le CEC s'achève avec le phénomène de relaxation caractérisé notamment par la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans la lumière du RS. Ce processus est opéré par la pompe SERCA2 sous contrôle de sa protéine modulatrice, le PLB (Figure 3). L'AKAP18 $\gamma/\delta$  (*AKAP15*, *AKAP7*) a été identifiée comme la protéine d'ancrage impliquée dans la régulation de l'activité de la SERCA2 en réponse à une stimulation  $\beta$ -AR [30]. Cette AKAP correspond à l'isoforme longue de l'AKAP18 et est localisée au niveau du RS. Suite à une stimulation des  $\beta$ -AR, la PKA ancrée à l'AKAP18 $\gamma/\delta$  phosphoryle le PLB sur la Ser16, levant ainsi l'inhibition du PLB sur la SERCA2 et permettant un re-pompage accru de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique dans le RS. Il a été montré chez la souris que la PDE3A et la PDE4D contrôlent l'activité PLB-SERCA2 et la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS [17]. Ceci a été confirmé chez l'homme pour la PDE3A et explique, avec l'augmentation d' $I_{\text{Ca,L}}$ , l'effet inotrope positif des inhibiteurs de PDE3.

#### 1.4.4 Régulation de l'appareil contractile

Au niveau des myofilaments, l'activation de la voie de signalisation  $\beta$ -AR-AMPc-PKA favorise la phosphorylation de la TnI et de la MyBP-C. La phosphorylation de la TnI permet de diminuer la sensibilité des myofilaments au  $\text{Ca}^{2+}$  tandis que la phosphorylation de MyBP-C augmente les cinétiques et la force de contraction du myocarde. Plusieurs études ont démontré dans des cardiomyocytes isolés ou dans des cœurs intacts que l'utilisation de petites molécules

délocalisant l'ancrage de la PKA aux AKAP inhibe la phosphorylation de TnI et MyBP-C induite par la PKA [31, 32]. Ces résultats indiquent que la phosphorylation de ces deux protéines sarcomériques est sous la dépendance de l'ancrage de la PKA à une ou plusieurs AKAP, et l'une d'elle pourrait être la troponine T [33]. La PDE4 est présente au niveau des myofilaments, mais les PDEs dégradant l'AMPc au voisinage de la TnI et de la MyBP-C n'ont pas été formellement identifiées.

## 2. Voie du guanosine monophosphate cyclique

Dans le cœur, la voie du GMPc est souvent vue comme l'image en miroir de celle de l'AMPc. En effet, une augmentation de GMPc exerce généralement un effet inotrope négatif en activant la protéine kinase GMPc-dépendante (PKG), qui inhibe le courant  $I_{Ca,L}$  [34] et phosphoryle la TnI pour réduire la sensibilité des myofilaments au  $Ca^{2+}$  [35]. La PKG peut également phosphoryler la titine au niveau des sarcomères et diminuer ainsi la rigidité du myocarde [36]. L'axe GMPc-PKG exerce aussi une action anti-hypertrophique sur le cœur, en inhibant la voie de la calcineurine et du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) [37]. Le GMPc peut enfin agir indépendamment de la PKG, en régulant les taux d'AMPc par l'intermédiaire de la PDE2 et de la PDE3. En effet, le GMPc inhibe l'hydrolyse de l'AMPc par la PDE3, car il entre en compétition avec l'AMPc au niveau du site catalytique de l'enzyme. A l'inverse, le GMPc augmente fortement l'activité d'hydrolyse de l'AMPc par la PDE2 de manière allostérique, en se liant au niveau du domaine GAFB situé dans la partie N-terminale de l'enzyme (Figure 2). Ces régulations s'opèrent pour des concentrations différentes de GMPc (submicromolaires pour l'inhibition de PDE3, micromolaires pour l'activation de PDE2), permettant au GMPc soit de stimuler soit d'inhiber le courant  $I_{Ca,L}$  dans l'oreillette humaine

[38.]. Elles semblent également opérer dans des compartiments différents [39]. Comme pour l'AMPc, la versatilité des actions du GMPc s'explique non seulement par la diversité de ses cibles, mais également par le fait que ce second messager est compartimenté dans les myocytes cardiaques.

## **2.1 Voies de synthèse du GMPc dans les myocytes cardiaques**

La production de GMPc intracardiaque est assurée par deux types de guanylate cyclases (GC), l'un soluble (sGC), cible du monoxyde d'azote (NO), et l'autre membranaire ou particulaire (pGC), cible des peptides natriurétiques, ANP, BNP et CNP (Figure 3). Le NO est produit aussi bien par les myocytes cardiaques que les cellules endothéliales avoisinantes, et deux formes de NO-synthétases (NOS), endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS), coexistent dans les myocytes cardiaques. Une troisième forme inductible (iNOS) est exprimée dans des situations pathologiques, comme le choc endotoxinique ou l'insuffisance cardiaque. La régulation de la fonction cardiaque par les NOS est traitée au chapitre 9.

L'ANP et le BNP exercent leurs effets par l'intermédiaire d'un récepteur à un segment transmembranaire, NPR-A (ou GC-A), tandis que le CNP agit via le récepteur de structure similaire nommé NPR-B (ou GC-B). Ces deux récepteurs possèdent une activité GC intrinsèque dans leur partie cytosolique. Un troisième récepteur, NPR-C, lie les trois peptides natriurétiques mais ne possède pas d'activité GC. En internalisant ces derniers, ce récepteur de clairance régule les taux plasmatiques des peptides natriurétiques [37].

Nous avons évoqué plus haut l'utilisation de canaux CNG olfactifs mutés pour la mesure de l'AMPc. La forme sauvage de ces canaux répond au GMPc, une propriété qui a permis de mettre en évidence que les peptides natriurétiques et les donneurs de NO produisent des « pools » de GMPc distincts dans les cardiomyocytes [40]. De façon intéressante, ces différents « pools » de GMPc produisent des effets différents : le GMPc stimulé par les donneurs de NO exerce un

effet inotrope négatif et augmente la relaxation [35] tandis que celui généré par l'activation du NPR-A n'a pas effet sur la contractilité [41] mais bloque l'activation de la voie calcineurine/NFAT [37]. En revanche, l'activation du NPR-B par le CNP potentialise l'effet inotrope d'une stimulation  $\beta$ -AR en inhibant la PDE3 [42]. En parallèle des travaux utilisant les canaux CNG, des senseurs FRET basés sur le site de liaison du GMPc de la PKG, de la PDE2 ou de la PDE5, ont été développés afin de mesurer ce second messenger (Figure 1D). La mesure du GMPc dans les cardiomyocytes adultes reste néanmoins difficile, une raison pouvant être que les senseurs actuels ne sont pas assez sensibles pour mesurer les faibles concentrations de GMPc dans le cardiomyocyte adulte (de l'ordre de 10 nM) [ref ??](#).

## 2.2 Contrôle du GMPc par les phosphodiesterases

Dans le cœur, les PDE1, PDE2, PDE3, PDE5 et PDE9 sont capables de dégrader le GMPc. L'utilisation des canaux CNG a permis de montrer que des familles de PDE différentes contrôlent le GMPc généré par les peptides natriurétiques et les donneurs de NO. Dans les myocytes ventriculaires de rat, la PDE2 hydrolyse spécifiquement le GMPc produit par stimulation du NPR-A, tandis que la PDE5 dégrade le GMPc produit en réponse aux donneurs de NO et prévient sa diffusion à la membrane plasmique [40]. Cette régulation par PDE5 est amplifiée par la PKG qui phosphoryle et active cette enzyme, donnant lieu à un rétrocontrôle négatif qui rappelle celui exercé par la PKA sur l'hydrolyse d'AMPc *via* l'activation de PDE3 et PDE4 [22]. A l'inverse, la PKG exerce un rétrocontrôle positif sur le GMPc produit par le NPR-A en potentialisant l'activité GC du récepteur [43]. L'utilisation de souris transgéniques exprimant un senseur FRET du GMPc dans les cardiomyocytes a montré en outre que la PDE3 pourrait participer à l'hydrolyse du GMPc basal ou produit par les peptides natriurétiques [44]. Récemment, il a été montré que la PDE9 est exprimée dans le cœur et contrôle spécifiquement le GMPc produit par les peptides natriurétiques. L'inhibition pharmacologique ou génétique de

la PDE9 potentialise les effets anti-hypertrophiques du GMPc chez la souris [45]. Comme pour l'AMPc, le rôle de PDE1 dans la compartimentation du GMPc n'est pas connu, lié en grande partie à l'absence d'inhibiteur spécifique disponible commercialement.

## **Conclusion**

Depuis la découverte de l'AMPc par Sutherland en 1957 et celle du GMPc par Ashman et Price en 1963, de nombreux travaux ont permis de mieux comprendre le rôle critique de ces seconds messagers en physiopathologie cardiovasculaire. Aujourd'hui, les  $\beta$ -bloquants sont une thérapie incontournable de l'IC chronique, les inhibiteurs de PDE3 sont utilisés dans l'IC aigüe et l'introduction récente du LCZ696, une molécule qui combine des propriétés d'antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II et d'inhibiteur de l'endopeptidase neutre (l'enzyme qui dégrade les peptides natriurétiques) démontre l'intérêt qui subsiste à moduler les voies des NC dans l'insuffisance cardiaque. Plus de cinquante ans de recherche fondamentale ont révélé de nombreux détails de l'organisation subcellulaire des voies de signalisation des NC dans les cardiomyocytes. L'importance de cette organisation pour la rapidité, la versatilité et la spécificité des actions de l'AMPc et du GMPc est aujourd'hui largement reconnue. De plus en plus de travaux décrivent les altérations de cette compartimentation dans l'IC. Malgré cela, de nombreux aspects de la régulation du cœur par les NC restent mal compris. Ainsi, le rôle respectif des isoformes de PKA dans le cœur n'est pas connu. Les mécanismes par lesquels les protéines Popeye, qui constituent une nouvelle classe de protéines liant directement l'AMPc, régulent la fréquence cardiaque, restent également à caractériser, et leur importance dans l'effet chronotrope positif d'une stimulation  $\beta$ -AR demande à être évaluée. Dans une perspective thérapeutique, il semble important de déterminer à l'avenir si l'inhibition d'Epac ou de PKA, ou l'activation de certaines PDE, pourrait présenter un avantage par rapport aux  $\beta$ -bloquants.

## References

1. Steinberg SF, Brunton LL. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:751-73.
2. Harvey RD, Calaghan SC. Caveolae create local signalling domains through their distinct protein content, lipid profile and morphology. *J Mol Cell Cardiol.* 2011.
3. Timofeyev V, Myers RE, Kim HJ, Woltz RL, Sirish P, Heiserman JP, et al. Adenylyl cyclase subtype-specific compartmentalization: differential regulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular myocytes. *Circ Res.* 2013;112:1567-76.
4. Guellich A, Mehel H, Fischmeister R. Cyclic AMP synthesis and hydrolysis in the normal and failing heart. *Pflugers Arch.* 2014;466:1163-75.
5. Haj Slimane Z, Bedioune I, Lechene P, Varin A, Lefebvre F, Mateo P, et al. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2014;102:97-106.
6. Pidoux G, Tasken K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol.* 2010;44:271-84.
7. Diviani D, Dodge-Kafka KL, Li J, Kapiloff MS. A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H1742-53.
8. Lezoualc'h F, Fazal L, Laudette M, Conte C. Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circ Res.* 2016;118:881-97.
9. Mangoni ME, Nargeot J. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev.* 2008;88:919-82.
10. Schindler RF, Brand T. The Popeye domain containing protein family - A novel class of cAMP effectors with important functions in multiple tissues. *Prog Biophys Mol Biol.* 2016;120:28-36.
11. Pereira L, Cheng H, Lao DH, Na L, van Oort RJ, Brown JH, et al. Epac2 Mediates Cardiac beta1-Adrenergic-Dependent Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak and Arrhythmia. *Circulation.* 2013;127:913-22.
12. Wang Z, Liu D, Varin A, Nicolas V, Courilleau D, Mateo P, et al. A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2198.



13. Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, Pons S, Conte C, Tortosa F, et al. Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res.* 2017;120:645-57.
14. Jurevicius J, Fischmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:295-9.
15. Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science.* 2002;295:1711-5.
16. Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol.* 2012;165:1288-305.
17. Bobin P, Belacel-Ouari M, Bedioune I, Zhang L, Leroy J, Leblais V, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Arch Cardiovasc Dis.* 2016;109:431-43.
18. Dittrich M, Jurevicius J, Georget M, Rochais F, Fleischmann B, Hescheler J, et al. Local response of L-type Ca<sup>2+</sup> current to nitric oxide in frog ventricular myocytes. *J Physiol.* 2001;534:109-21.
19. Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, et al. Compartmentalized Phosphodiesterase-2 Activity Blunts {beta}-Adrenergic Cardiac Inotropy via an NO/cGMP-Dependent Pathway. *Circ Res.* 2005;98:226-34.
20. Monterisi S, Lobo MJ, Livie C, Castle JC, Weinberger M, Baillie G, et al. PDE2A2 regulates mitochondria morphology and apoptotic cell death via local modulation of cAMP/PKA signalling. *Elife.* 2017;6.
21. Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med.* 1991;325:1468-75.
22. Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet JL, et al. Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem.* 2004;279:52095-105.
23. Scott JD, Santana LF. A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation.* 2010;121:1264-71.

24. Diviani D, Reggi E, Arambasic M, Caso S, Maric D. Emerging roles of A-kinase anchoring proteins in cardiovascular pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:1926-36.
25. Jones BW, Brunet S, Gilbert ML, Nichols CB, Su T, Westenbroek RE, et al. Cardiomyocytes from AKAP7 knockout mice respond normally to adrenergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:17099-104.
26. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*. 1999;127:65-74.
27. Leroy J, Richter W, Mika D, Castro LR, Abi-Gerges A, Xie M, et al. Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex regulates Ca<sup>2+</sup> current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2651-61.
28. Kapiloff MS, Schillace RV, Westphal AM, Scott JD. mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes. *J Cell Sci*. 1999;112 ( Pt 16):2725-36.
29. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101:365-76.
30. Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, et al. AKAP complex regulates Ca<sup>2+</sup> re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 2007;8:1061-7.
31. Christian F, Szaszak M, Friedl S, Drewianka S, Lorenz D, Goncalves A, et al. Small Molecule AKAP-Protein Kinase A (PKA) Interaction Disruptors That Activate PKA Interfere with Compartmentalized cAMP Signaling in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem*. 2011;286:9079-96.
32. McConnell BK, Popovic Z, Mal N, Lee K, Bautista J, Forudi F, et al. Disruption of protein kinase A interaction with A-kinase-anchoring proteins in the heart in vivo: effects on cardiac contractility, protein kinase A phosphorylation, and troponin I proteolysis. *J Biol Chem*. 2009;284:1583-92.
33. Sumandea CA, Garcia-Cazarin ML, Bozio CH, Sievert GA, Balke CW, Sumandea MP. Cardiac troponin T, a sarcomeric AKAP, tethers protein kinase A at the myofilaments. *J Biol Chem*. 2011;286:530-41.

34. Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:1197-201.
35. Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. 2002;540:457-67.
36. Kruger M, Kotter S, Grutzner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, et al. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*. 2009;104:87-94.
37. Kuhn M. Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev*. 2016;96:751-804.
38. Vandecasteele G, Verde I, Rucker-Martin C, Donzeau-Gouge P, Fischmeister R. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes. *J Physiol*. 2001;533:329-40.
39. Stangherlin A, Gesellchen F, Zoccarato A, Terrin A, Fields LA, Berrera M, et al. cGMP Signals Modulate cAMP Levels in a Compartment-Specific Manner to Regulate Catecholamine-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2011.
40. Castro LR, Verde I, Cooper DM, Fischmeister R. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation*. 2006;113:2221-8.
41. Takimoto E, Belardi D, Tocchetti CG, Vahebi S, Cormaci G, Ketner EA, et al. Compartmentalization of cardiac beta-adrenergic inotropy modulation by phosphodiesterase type 5. *Circulation*. 2007;115:2159-67.
42. Meier S, Andressen KW, Aronsen JM, Sjaastad I, Hougen K, Skomedal T, et al. PDE3 inhibition by C-type natriuretic peptide-induced cGMP enhances cAMP-mediated signaling in both non-failing and failing hearts. *Eur J Pharmacol*. 2017;812:174-83.
43. Castro LR, Schittl J, Fischmeister R. Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 2010;107:1232-40.
44. Gotz KR, Sprenger JU, Perera RK, Steinbrecher JH, Lehnart SE, Kuhn M, et al. Transgenic mice for real-time visualization of cGMP in intact adult cardiomyocytes. *Circ Res*. 2014;114:1235-45.
45. Lee DI, Zhu G, Sasaki T, Cho GS, Hamdani N, Holewinski R, et al. Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature*. 2015;519:472-6.

## Légendes des Figures

**Figure 1: Méthodes de mesure en temps réel des nucléotides cycliques.** (A) canaux CNG, ouverts par les nucléotides cycliques. La forme sauvage de ces canaux, normalement exprimés dans les neurones sensoriels, constitue un bon senseur du GMPc, tandis que la forme mutée E583M permet de mesurer l'AMPc. (B) Bio-senseur AMPc basé sur la PKA. La PKA est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités catalytiques (C) liées à un dimère de sous-unités régulatrices (R). Une protéine fluorescente CFP (Cyan Fluorescent Protein) est fusionnée à chaque sous-unité R, tandis qu'une protéine fluorescente YFP (Yellow Fluorescent Protein) est fusionnée à chaque sous-unité C. En absence d'AMPc, la proximité des deux fluorophores permet le transfert d'énergie de fluorescence de la CFP (donneur) vers la YFP (accepteur) par résonance de type Förster (FRET). La YFP va alors émettre avec un pic d'émission à 535 nm. Lorsque l'AMPc augmente, la dissociation des sous-unités C du dimère de sous-unités R provoque l'abrogation du phénomène de FRET entre la CFP et la YFP. Lorsqu'elle est excitée à 436 nm, la CFP émet alors par fluorescence classique avec un pic à 480 nm. Le rapport des émissions des deux fluorophores à 535 nm et à 480 nm constitue donc un index de la concentration d'AMPc intracellulaire. (C) Bio-senseurs FRET monomoléculaires pour l'AMPc ou le GMPc. Un domaine central issu d'une protéine liant l'AMPc (le plus souvent, Epac1) ou le GMPc (PKG, PDE2 ou PDE5) et incluant le site de liaison au nucléotide cyclique est inséré entre deux fluorophores (CFP et YFP ou des dérivés). En absence d'AMPc, le bio-senseur est dans une conformation repliée permettant le FRET entre la CFP et la YFP. L'augmentation d'AMPc ou de GMPc provoque un changement de conformation éloignant les deux fluorophores et abrogeant le FRET entre la CFP et la YFP.

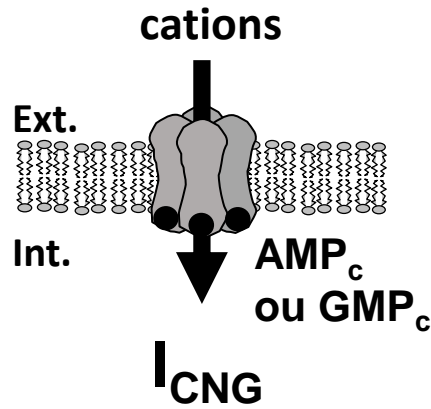
**Figure 2: Représentation schématique de la structure primaire des 7 familles de phosphodiésterases (PDEs) exprimées dans le cœur, illustrant leurs différents domaines fonctionnels.** Le domaine catalytique conservé (en gris foncé) est localisé dans la partie C-terminale des PDEs. Les PDE3 contiennent une insertion unique de 44 acides aminés (en noir) dont la fonction reste méconnue. Le domaine amino-terminal régulateur contient divers sous-domaines caractéristiques de chaque famille: domaines de liaison au complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline sur PDE1, domaines GAF de liaison au GMPc sur PDE2 et PDE5, domaines d'adressage membranaire sur PDE3, domaines conservés UCR1 et UCR2 sur PDE4, domaines

PAS (*Per-Arnt-Sim*) d'interaction avec des ligands ou des protéines dans PDE8, domaine REC (*signal receiver or response regulator domains*) dans PDE8, domaine Pat7 de localisation nucléaire dans PDE9. Les sites de phosphorylation connus sur les différentes PDEs sont indiqués. PKA protéine kinase AMPc-dépendante; PKB, protéine kinase B (ou Akt), PKC; protéine kinase C, CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; ERK2, extracellular signal-regulated kinase 2.

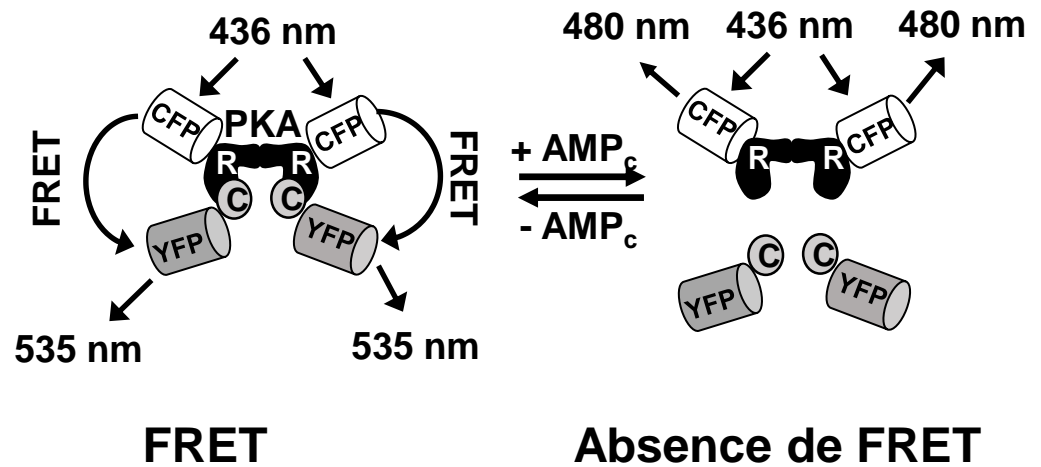
**Figure 3: Voies de signalisation des nucléotides cycliques dans les myocytes cardiaques.**

La noradrénaline relâchée par les terminaisons nerveuses sympathiques et l'adrénaline circulante issue des glandes surrénales agissent sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques des cardiomyocytes ( $\beta_1$ -ARs majoritaire;  $\beta_2$ -ARs) couplés aux protéines Gs pour augmenter la synthèse d'AMPc par les adénylates cyclases (AC) transmembranaires. Les taux d'AMPc sont diminués par les récepteurs muscariniques M2 de l'acétylcholine (ACh), le médiateur du système nerveux parasympathique, et les récepteurs A1 de l'adénosine (non représentés), tous deux couplés aux protéines G<sub>i</sub> inhibitrices des AC. Les niveaux de GMPc sont contrôlés par les peptides natriurétiques (ANP, BNP, CNP) qui agissent sur les guanylates cyclases particulières (GCp) et par le NO agissant sur la guanylate cyclase soluble (sGC). Différentes familles de phosphodiésterases (PDEs) hydrolysent l'AMPc et/ou le GMPc dans de multiples compartiments des cardiomyocytes. Ces PDEs exercent ainsi un contrôle dynamique de la diffusion des NC dans les cardiomyocytes et de leur concentration au voisinage des différents effecteurs. Ces effecteurs sont, pour l'AMPc, d'une part la protéine kinase A (PKA), qui est localisée par les protéines d'ancrage AKAP au voisinage immédiat des protéines clés du couplage excitation-contraction, et au niveau de divers organelles dont les noyaux. Mais également les protéines Epac1 et Epac2, impliquées dans l'hypertrophie cardiaque, l'apoptose et les arythmies; les canaux HCN exprimés dans le tissu conducteur et impliqués dans le chronotropisme; et les protéines Popeye nouvellement identifiées (non représentées). L'effecteur principal du GMPc est la protéine kinase G (PKG) qui exerce des effets opposés à ceux de l'AMPc notamment en inhibant le canaux calciques de type L et en réduisant l'affinité des myofilaments au calcium.

# A Canaux CNG



# B Biosenseur FRET basé sur la PKA



# C Biosenseurs FRET monomoléculaires ( $AMP_c$ ou $GMP_c$ )

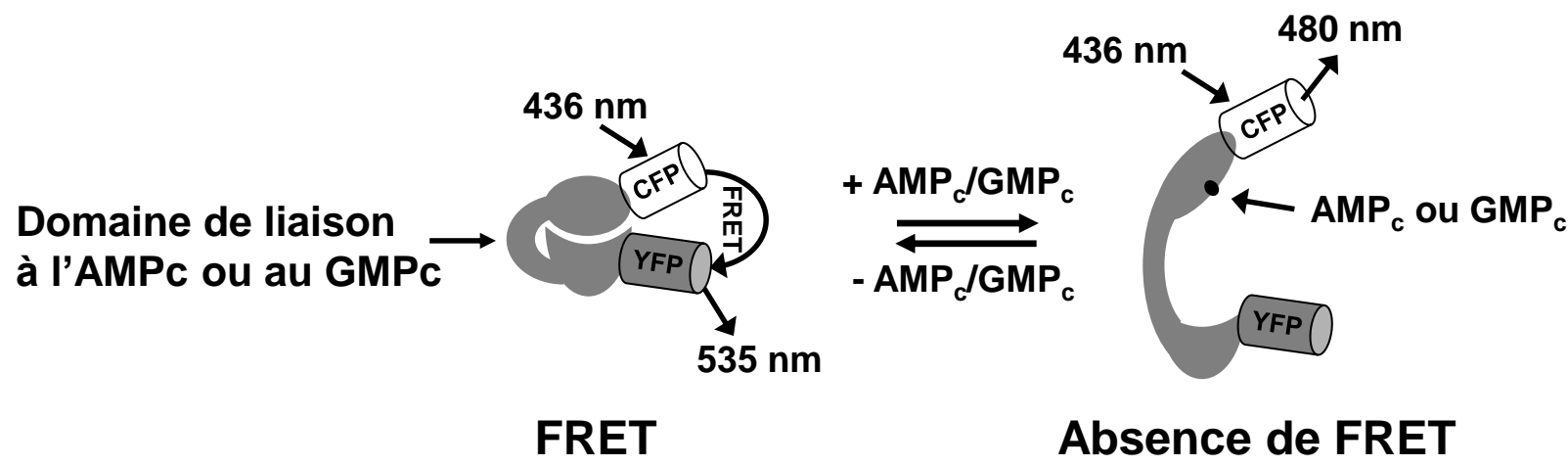
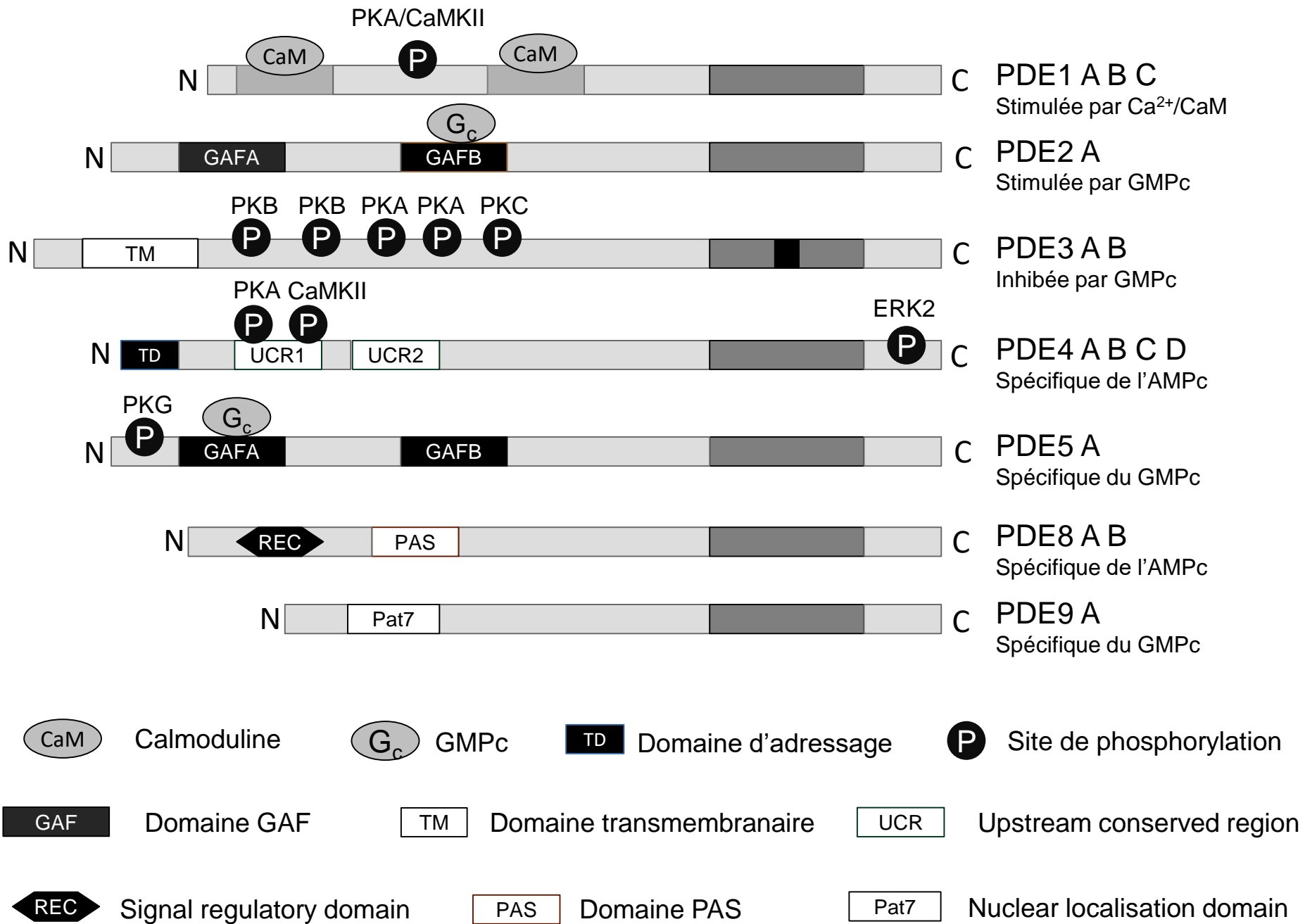


Figure 1



**Figure 2**

